

URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ



ZAŚWIADCZENIE

Instytut Włókien Chemicznych

Łódź, Polska

złożył w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej dnia 09 stycznia 2002 r. podanie o udzielenie patentu na wynalazek pt., Sposób wytwarzania modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu.”

Dołączone do niniejszego zaświadczenia opis wynalazku, zastrzeżenia patentowe są wierną kopią dokumentów złożonych przy podaniu w dniu 09 stycznia 2002 r.

Podanie złożono za numerem P-351600.

Warszawa, dnia 20 lutego 2003 r.

z upoważnienia Prezesa

mgr Jowita Mazur
Specjalista

**PRIORITY
DOCUMENT BEST AVAILABLE COPY**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Sposób wytwarzania modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu.

008832102

Znany jest z patentu polskiego PL 125 995 oraz z czasopisma „Journal of Applied Polymer Science”, tom 33, s.177, 1987 r. sposób wytwarzania chitozanu o rozbudowanej powierzchni wewnętrznej metodą periodyczną polegającą na okresowym wytrącaniu chitozanu z jego roztworów w wodnych roztworach kwasów organicznych, nieorganicznych lub ich soli za pomocą roztworów wodorotlenków metali ziem alkalicznych przy stosowaniu silnego mieszania. Wytrącony chitozan w postaci zawiesiny poddaje się procesowi oczyszczania w drodze wielokrotnego przemywania wodą. Znany sposób pozwala na wytworzenie chitozanu o rozwiniętej powierzchni wewnętrznej z wydajnością 70 – 90 % wydajności teoretycznej. Cykl produkcyjny trwa co najmniej 12 – 24 godziny przy niejednorodności właściwości w poszczególnych partiach, dużej skłonności do daleko posuniętej degradacji jak i stosunkowo niedużych właściwościach sorpcyjnych przy stosunkowo niewielkiej rozwiniętej powierzchni wewnętrznej chitozanu. Znany jest także z patentu polskiego PL 164247 i opisu patentu fińskiego FI 83426 sposób wytwarzania mikrokrystalicznego chitozanu metodą ciągłą. Sposób ten polega na tym, że roztwór chitozanu w wodnych roztworach kwasów i/lub ich soli wprowadza się do reaktora wraz z wodnym roztworem wodorotlenków metali ziem alkalicznych i/lub ich soli aż do wytworzenia mikrokrystalicznego chitozanu w środowisku alkalicznym przy $pH > 7$, przy czym jednocześnie odprowadza się z reaktora w sposób ciągły wytworzoną alkaliczną zawiesinę mikrokrystalicznego chitozanu. Roztwór alkaliczny może być także wprowadzany bezpośrednio do układu recyrkulacyjnego. Sposób ten nie pozwala na wytworzenie mikrokrystalicznego chitozanu o średniej wielkości aglomeratów poniżej

1 μm i powierzchni wewnętrznej, charakteryzowanej przez wskaźnik wtórnego pęcznienia, powyżej 5000 %, a wydajność procesu nie przekracza 90%. Ponadto nie jest możliwe kontrolowanie struktury cząsteczkowej, nadcząsteczkowej i morfologicznej powstającego mikrokryształicznego chitozanu. Proces ten prowadzi także do istotnego obniżenia średniego ciężaru cząsteczkowego powstającego mikrokryształicznego chitozanu w wyniku intensywnego procesu degradacji.

Z opisu polskiego zgłoszenia patentowego P. 340132 oraz zgłoszenia międzynarodowego WO01/87988 znany jest sposób wytwarzania modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu polegający na tym, że roztwór chitozanu w wodnych roztworach kwasów i/lub ich soli o stężeniu polimeru nie niższym niż 0,001% wagowych poddaje się zobojętnianiu, przy intensywnym mieszaniu z prędkością 10 - 1000 obr./min., za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków i/lub ich soli, o stężeniu 0,01 - 20% wagowych do uzyskania odczynu środowiska $\text{pH} = 5,0 - 6,9$, przy którym następuje przejście soli chitozanu w żel. Wytworzony żel homogenizuje się z prędkością 100 - 5000 obrotów/minutę w czasie nie krótszym niż 10 sekund. Następnie przy ciągłym, intensywnym mieszaniu z prędkością 100 - 5000 obr./min. prowadzi się alkalizację żelu za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków o stężeniu 0,01 - 20% wagowych do uzyskania odczynu środowiska nie niższego niż $\text{pH} = 6,9$. Wytworzony żelopodobny mikrokryształiczny chitozan oczyszcza się oraz ewentualnie zateża i suszy znanymi metodami. Sposób ten nie pozwala na wytworzenie modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu o kontrolowanej strukturze cząsteczkowej, nadcząsteczkowej i morfologicznej oraz założonych właściwościach, zwłaszcza biologicznych.

Sposób wytwarzania modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu poprzez wytrącanie chitozanu z jego wodnych roztworów w kwasach za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków i/lub ich soli, według wynalazku polega na tym, że chitozan, którego stężenie w wodnym roztworze kwasu wynosi nie mniej niż 0,001% wagowego, korzystnie 0,1-2% wagowych, poddaje się najpierw kontrolowanej degradacji dla uzyskania jego założonego średniego ciężaru cząsteczkowego i stopnia polidispersji. Następnie chitozan poddaje się alkalizacji przy intensywnym mieszaniu z prędkością nie większą niż 10000 obrotów/minutę, za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków i/lub ich soli o stężeniu 0,01-20% wagowych do uzyskania odczynu środowiska nie niższego niż $\text{pH}=7,0$. Wytrącony modyfikowany mikrokryształiczny chitozan oczyszcza się oraz ewentualnie zateża i suszy znanymi metodami.

Chitozan według wynalazku poddaje się degradacji enzymatycznej, hydrolitycznej lub utleniającej.

Degradację enzymatyczną chitozanu prowadzi się za pomocą enzymów, jak celulazy, chitanazy czy ksylanazy, w temperaturze nie niższej niż 20°C, korzystnie 30-60°C, w czasie od 1 minuty do 100 godzin, przy aktywności enzymów nie niższej niż 0,01 jednostek /cm³, przy czym pozostałe enzymy dezaktywuje się w temperaturze nie niższej niż 70°C.

Degradację hydrolityczną chitozanu prowadzi się w temperaturze nie niższej niż 20°C, korzystnie 40-80°C w czasie od 1 minuty do 100 godzin, korzystnie w obecności mocnych kwasów, jak kwas solny, czy chlorooctowy, użytych w ilości nie mniejszej niż 0,001% wagowego w stosunku do chitozanu.

Degradację utleniającą chitozanu prowadzi się według wynalazku za pomocą środków utleniających, jak nadtlenek wodoru czy nadboran sodowy, użytych w ilości nie mniejszej niż 0,001% wagowego, korzystnie 0,01-0,5% wagowego, w stosunku do chitozanu, w czasie nie krótszym niż 1 minuta, w temperaturze nie niższej niż 20°C, korzystnie 30-60°C.

Sposób wytwarzania modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu według wynalazku polega także na tym, że chitozan, którego stężenie w wodnym roztworze kwasu jest nie mniejsze niż 0,001% wagowego, korzystnie 0,1-2% wagowych, poddaje się alkalizacji, przy intensywnym mieszaniu z prędkością nie wyższą niż 10000 obrotów/minutę, za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków i/lub ich soli o stężeniu 0,01-20% wagowych do uzyskania odczynu środowiska nie niższego niż pH=7,0. Następnie wytrącony z roztworu mikrokrystaliczny chitozan poddaje się kontrolowanej degradacji dla uzyskania jego założonego średniego ciężaru cząsteczkowego i stopnia polidispersji. Wytworzony modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan oczyszcza się oraz ewentualnie zateża i suszy znanymi sposobami.

Mikrokrystaliczny chitozan według wynalazku poddaje się degradacji enzymatycznej lub utleniającej.

Degradację enzymatyczną mikrokrystalicznego chitozanu prowadzi się za pomocą enzymów aktywnych w środowisku obojętnym i/lub alkalicznym, jak celulazy, w temperaturze nie niższej niż 20°C, korzystnie 30-60°C w czasie od 1 minuty do 100 godzin, w środowisku o pH nie niższym niż 7,0, przy aktywności enzymów nie niższej niż 0,01 jednostek CMC/cm³. Pozostałe po degradacji enzymy dezaktywuje się w temperaturze powyżej 70°C.

Degradację utleniającą mikrokrystalicznego chitozanu prowadzi się za pomocą środków utleniających, jak nadtlenek wodoru czy nadboran sodowy, użytych w ilości nie mniejszej niż 0,001% wagowego, korzystnie 0,01-0,5% wagowego w stosunku do

chitozanu, w czasie nie krótszym niż 1 minuta, w temperaturze nie niższej niż 20°C, korzystnie 30-60°C.

Według wynalazku stosuje się wodne roztwory chitozanu w kwasie octowym, mlekowym, cytrynowym lub solnym, o pH nie wyższym niż 6,9.

W procesie alkalizacji stosuje się wodne roztwory wodorotlenku sodowego, potasowego lub amonowego i/lub ich soli, jak węglan sodowy, węglan potasowy czy węglan amonowy.

Wytwarzanie modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu według wynalazku można prowadzić metodą periodyczną lub ciągłą.

Sposobem według wynalazku wytwarza się modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan o założonej, kontrolowanej strukturze cząsteczkowej, nadcząsteczkowej i morfologicznej w wyniku zastosowania w procesie jego wytwarzania degradacji enzymatycznej, hydrolitycznej lub utleniającej makrocząsteczek chitozanu rozpuszczonych w roztworach kwasów lub poddanie degradacji enzymatycznej lub utleniającej wytrąconego z roztworu mikrokrystalicznego chitozanu. Proces degradacji enzymatycznej pozwala na otrzymanie mikrokrystalicznego chitozanu o obniżonym średnim ciężarze cząsteczkowym i obniżonej wartości stopnia polidispersji. Ponadto stosowane enzymy oddziałują także na inne właściwości mikrokrystalicznego chitozanu, jak: wskaźnik wtórnego pęcznienia, wymiary cząstek czy stopień krystaliczności. Degradacja hydrolityczna, zwłaszcza w obecności silnych kwasów, pozwala na otrzymanie polimeru o obniżonym średnim ciężarze cząsteczkowym i podwyższonym stopniu polidispersji. Modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan otrzymywany według wynalazku charakteryzuje się szerokim zakresem kontrolowanego poziomu wartości średniego ciężaru cząsteczkowego w stosunku do wyjściowego chitozanu.

Kontrolowana degradacja chitozanu w układzie homogenicznym przed procesem wytwarzania mikrokrystalicznego chitozanu pozwala na dostosowanie jego struktury do optymalnych warunków aglomeracji. Dzięki modyfikacji chitozanu w tym etapie otrzymywany mikrokrystaliczny chitozan charakteryzuje się założonymi właściwościami fizyko-chemicznymi, użytkowymi i biologicznymi, zwłaszcza kontrolowaną bioaktywnością, biodegradowalnością oraz biogodnością. Prowadzenie degradacji mikrokrystalicznego chitozanu w postaci aglomeratów sposobem według wynalazku przebiega w układzie heterofazowym i pozwala na kontrolowaną modyfikację jego struktury, przede wszystkim biodegradację frakcji niskocząsteczkowych chitozanu oraz zmianę struktury morfologicznej, rozszerzając zakres parametrów produktu takich jak wskaźnik wtórnego pęcznienia, porowatość, zdolność sorpcyjną czy też aktywność

biologiczną. Tak prowadzony proces degradacji jest równocześnie kontrolowany przez dyfuzję enzymu czy środka utleniającego do struktury aglomeratów.

Założona struktura modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w istotny sposób wpływa na wiele jego właściwości, takich jak: biodegradowalność, bioaktywność, porowatość, adhezyjność, mieszalność z innymi polimerami czy stabilność.

Zaletą sposobu według wynalazku jest wytwarzanie modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu o założonych właściwościach w postaci zawiesiny, pasty czy proszku dostosowanych do przewidywanego zastosowania.

Istotną zaletą sposobu według wynalazku jest wytwarzanie modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu o ściśle jednorodnych i powtarzalnych właściwościach niezbędnych zwłaszcza do zastosowań medycznych.

Modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan otrzymany sposobem według wynalazku znajduje szerokie zastosowanie w medycynie, weterynarii czy farmacji.

Sposób według wynalazku ilustrują podane poniżej przykłady nie ograniczając jego zakresu.

Przykład I. Do reaktora zaopatrzonego w mieszadło oraz płaszcz grzejno-chłodzący wprowadzono 1500 części wagowych 0,5 % wodnego roztworu chitozanu w 0,25 % wodnym roztworze kwasu mlekowego, przy czym polimer charakteryzował się średnim ciężarem cząsteczkowym $M_v = 345,6$ kD, stopniem deacetylacji $DD = 82,2$ % i stopniem polidispersji $Pd = 3,45$. Następnie do reaktora, przy ciągłym mieszaniu z prędkością 150 obr/min, wprowadzano 50 cm³/min 1,0 % wodnego roztworu wodorotlenku sodowego do uzyskania odczynu mieszaniny reakcyjnej $pH = 5,5$, po czym wprowadzano 1,5 części wagowych roztworu celulazy o nazwie *Ekonaza CE* o wyjściowej aktywności endo-1,4- β -glukanazy 2600 J CMC/cm³. Aktywność enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 2,6 J CMC/cm³. Proces degradacji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 20°C przez 16 godzin przy ciągłym mieszaniu, po czym dezaktywowano enzym w temperaturze 80°C przez 15 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 25°C i przy ciągłym mieszaniu z prędkością 150 obr/min wprowadzono 1,0 % wodny roztwór wodorotlenku sodowego w czasie 30 minut do uzyskania odczynu $pH = 8,0$ i wytrącenia aglomeratów modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu. W tych warunkach kontynuowano homogenizację przez kolejne 15 minut. Wytworzony mikrokrystaliczny chitozan oczyszczano przez ciągłe przemywanie wodą do uzyskania $pH = 7,25$ i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń, po czym zatężano go.

Otrzymano 280 części wagowych modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w postaci białej, żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 2,41 % wagowych polimeru, charakteryzującego się $M_v = 60,1$ kD, $Pd = 2,09$, $DD = 82,2$ %, oraz $WRV = 1630$ %.

Przykład II. Do reaktora jak w przykładzie I, wprowadzono 1500 części wagowych 0,5 % wodnego roztworu chitozanu w 0,25 % wodnym roztworze kwasu mlekowego, przy czym polimer charakteryzował się średnim ciężarem cząsteczkowym $M_v = 237,0$ kD, stopniem deacetylacji $DD = 84,3$ % i stopniem polidispersji $Pd = 3,49$. Następnie do reaktora, przy ciągłym mieszaniu z prędkością 150 obr/min, dodawano 25 cm³/min 1,0% wodnego roztworu wodorotlenku sodowego do uzyskania odczynu mieszaniny reakcyjnej $pH = 5,2$, po czym prowadzono wprowadzanie 1,5 części wagowych roztworu celulazy o nazwie *Ekonaza CE* o wyjściowej aktywności endo-1,4- β -glukanazy 2600 J CMC/cm³. Aktywność enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 2,6 J CMC/cm³. Proces kontrolowanej degradacji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 20°C w czasie 1 godziny, po czym dezaktywowano enzym w temperaturze 80°C przez 5 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 21°C i przy ciągłym mieszaniu z prędkością 150 obr/min wprowadzono 5,0 % wodny roztwór NH₄OH w czasie 30 minut do uzyskania odczynu $pH = 8,0$ i wytrącenia aglomeratów modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu. W tych warunkach kontynuowano homogenizację przez kolejne 30 minut. Wytworzony mikrokrystaliczny chitozan oczyszczano przez ciągłe przemywanie wodą do uzyskania $pH = 7,2$ i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń, po czym zateżano go.

Otrzymano 210 części wagowych modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w postaci białej, żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 3,25 % wagowych polimeru charakteryzującego się $M_v = 209,9$ kD, $Pd = 3,16$, $DD = 84,2$ % oraz $WRV = 955,0$ %.

Przykład III. Do reaktora jak w przykładzie I wprowadzono 20 000 części wagowych 1,0 % wodnego roztworu chitozanu w 0,4 % wodnym roztworze kwasu solnego, przy czym polimer charakteryzował się średnim ciężarem cząsteczkowym $M_v = 796,5$ kD, stopniem deacetylacji $DD = 85,6$ % i stopniem polidispersji $Pd = 3,23$. Następnie do reaktora, przy ciągłym mieszaniu z prędkością 480 obr/min, dodawano 50 cm³/min 0,5 % wodnego roztworu wodorotlenku sodowego do uzyskania odczynu mieszaniny reakcyjnej $pH = 5,2$, po czym wprowadzono 11 części wagowych celulazy o nazwie *Ekonaza CE* o wyjściowej aktywności endo-1,4- β -glukanazy 2600 J CMC/cm³. Aktywność enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 1,315 J CMC/cm³. Proces

kontrolowanej degradacji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 20°C przez 15 minut, po czym dezaktywowano enzym w temperaturze 80°C w czasie 15 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 25 °C i przy ciągłym mieszaniu z prędkością 480 obr/min wprowadzono 0.5 % wodny roztwór wodorotlenku sodowego w czasie 90 minut do uzyskania odczynu $\text{pH}=7.69$ i wytrącenia aglomeratów modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu. W tych warunkach kontynuowano homogenizację przez kolejne 15 minut. Wytworzony mikrokrystaliczny chitozan oczyszczano przez ciągle przemywanie wodą do uzyskania $\text{pH}=7.3$ i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń.

Otrzymano 5015 części wagowych modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w postaci białej, żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 3.46 % wagowych polimeru charakteryzującego się $\bar{M}_v=387,0 \text{ kD}$, $\text{Pd}=3,13$, $\text{DD}=85,6 \%$ i $\text{WRV}=870,0 \%$.

Przykład IV. Do reaktora jak w przykładzie I wprowadzono 1000 części wagowych 1.0 % wodnego roztworu chitozanu, o właściwościach jak w przykładzie III, w 0,4 % wodnym roztworze kwasu solnego. Następnie do reaktora, przy ciągłym mieszaniu z prędkością 1000 obr/min, wprowadzano 50 cm^3/min 0,75 % wodnego roztworu wodorotlenku sodowego do uzyskania odczynu mieszaniny reakcyjnej $\text{pH}=6.53$, po czym dodano 0,2 części wagowych celulazy o nazwie *Ekonaza CE* o wyjściowej aktywności endo-1,4- β -glukanazy 2600 J CMC/ cm^3 . Aktywność enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 0,52 J CMC/ cm^3 . Proces kontrolowanej degradacji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 20 °C w czasie 10 minut, po czym dezaktywowano enzym w temperaturze 80 °C w czasie 10 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 25 °C i przy ciągłym mieszaniu z prędkością 4000 - 4500 obr/min wprowadzono 0,75 % wodny roztwór wodorotlenku sodowego w czasie 30 minut do uzyskania odczynu $\text{pH}=7,65$ i wytrącenia modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu. W tych warunkach kontynuowano homogenizację przez kolejne 15 minut. Wytworzony mikrokrystaliczny chitozan oczyszczano przez ciągle przemywanie wodą do uzyskania $\text{pH}=7,15$ i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń, po czym zatężano go.

Otrzymano 415 części wagowych modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w postaci białej, żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 2.12 % wagowych polimeru charakteryzującego się $\bar{M}_v=514,0 \text{ kD}$, $\text{Pd}=2,90$, $\text{DD}=85,6 \%$ i $\text{WRV}=1100,0 \%$.

Przykład V. Do reaktora jak w przykładzie I wprowadzono 1500 części wagowych 0,75 % roztworu chitozanu, o właściwościach jak w przykładzie II, w 0,5 % wodnym

roztworze kwasu mlekowego. Następnie do reaktora, przy ciągłym mieszaniu z prędkością 1000 obr/min, wprowadzano 50 cm³/min 2,0 % wodnego roztworu wodorotlenku sodowego do uzyskania odczynu mieszaniny reakcyjnej pH = 6,0, po czym wprowadzono 3,9 części wagowych ksylanazy o wyjściowej aktywności endo-1,4- β -ksylanazy równej 13949 J Xyl/cm³ i endo-1,4- β -glukanazy równej 411 J CMC/cm³. Aktywność enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosiła odpowiednio 37 JXyl/ cm³ i 1,1 J CMC/cm³. Proces kontrolowanej degradacji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 20°C w czasie 16 godzin, po czym dezaktywowano enzym w temperaturze 80°C przez 15 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 20°C i przy ciągłym mieszaniu z prędkością 1000 obr/min wprowadzono 2,0 % wodny roztwór wodorotlenku sodowego w czasie 30 minut do uzyskania odczynu pH = 6,80, po czym zwiększano intensywność mieszania do 8000 obr/min i proces aglomeracji prowadzono do uzyskania odczynu pH= 7,50 w czasie 15 minut i wytrącenia aglomeratów modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu. W tych warunkach kontynuowano homogenizację przez kolejne 15 minut. Wytworzony modyfikowany mikrokryształiczny chitozan oczyszczano przez ciągłe przemywanie wodą do uzyskania pH= 7,2 i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń. Otrzymano 320 części wagowych modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu w postaci białej, żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 3,18 % wagowych polimeru, charakteryzującego się $M_v = 140,0$ kD, $P_d = 3,04$, $DD = 84,3$ % i $WRV = 3800$ %.

Przykład VI. Do reaktora jak w przykładzie I, wprowadzono 2000 części wagowych 0,25 % wodnego roztworu chitozanu w 0,6 % wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym polimer charakteryzował się średnim ciężarem cząsteczkowym $\bar{M}_v = 143,9$ kD, stopniem deacetylacji $DD = 78,5$ % i stopniem polidispersji $P_d = 2,94$. Następnie do reaktora wprowadzono, przy ciągłym mieszaniu z prędkością 200 obr/min, 5,0 % wodny roztwór wodorotlenku sodowego do uzyskania odczynu mieszaniny reakcyjnej pH = 6,80, po czym dodano 20 części wagowych neutralnej celulazy o wyjściowej aktywności endo-1,4- β -glukanazy 186 J CMC/cm³. Aktywność enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 1,9 J CMC/cm³. Proces kontrolowanej degradacji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 20°C w czasie 5 godzin, po czym dezaktywowano enzym w temperaturze 80 ° C przez 15 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 18 °C i przy ciągłym mieszaniu z prędkością 200 obr/min wprowadzono 5,0 % wodny roztwór wodorotlenku sodowego w czasie 60 minut do uzyskania odczynu pH=8,0 i wytrącenia aglomeratów modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu. W tych warunkach kontynuowano homogenizację przez

kolejne 15 minut. Wytworzony modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan oczyszczano przez ciągle przemywanie wodą do uzyskania $pH = 7,2-7,3$ i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń, po czym zatężano go.

Otrzymano 150 części wagowych modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w postaci szarej, żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 2,99 % wagowych polimeru charakteryzującego się $M_v = 44,3$ kD, $Pd = 3,25$, $DD = 78,5$ % i $WRV = 1250$ %.

Przykład VII. Do reaktora jak w przykładzie I, wprowadzono 1500 części wagowych 0,5 % roztworu chitozanu w 0,25 % wodnym roztworze kwasu solnego, przy czym polimer charakteryzował się $M_v = 345,6$ kD, $DD = 82,2$ % i $Pd = 2,92$. Następnie do reaktora, przy ciągłym mieszaniu z prędkością 150 obr/min, wprowadzano $125\text{cm}^3/\text{min}$ 5,0 % wodnego roztworu wodorotlenku sodowego do uzyskania odczynu mieszaniny reakcyjnej $pH = 7,9$ i wytrącenia aglomeratów mikrokrystalicznego chitozanu. W tych warunkach kontynuowano homogenizację przez kolejne 15 minut. Następnie do reaktora wprowadzono 15,4 części wagowe neutralnej celulazy o wyjściowej aktywności endo-1,4- β -glukanazy $186\text{ J CMC}/\text{cm}^3$. Aktywność enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosiła $1,9\text{ J CMC}/\text{cm}^3$. Proces kontrolowanej degradacji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 20°C w ciągu 2 godzin, przy ciągłym mieszaniu po czym dezaktywowano enzym w temperaturze 80°C w ciągu 5 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 20°C i przy ciągłym mieszaniu z prędkością 200 obr/min wprowadzono 5,0 % wodny roztwór wodorotlenku sodowego w czasie 60 minut do uzyskania odczynu $pH = 7,8$ i wytrącenia aglomeratów modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu. W tych warunkach kontynuowano homogenizację przez kolejne 15 minut. Modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan oczyszczano przez ciągle przemywanie wodą do uzyskania $pH = 7,2-7,3$ i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń.

Otrzymano 250 części wagowych modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w postaci szarej, żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 2,64 % wagowych polimeru, charakteryzującego się $M_v = 167,6$ kD, $Pd = 2,77$, $DD = 62,6$ % i $WRV = 1860$ %.

Przykład VIII. Do reaktora wyposażonego w mieszadło, płaszcz grzejny oraz układ recyrkulacyjny z pompą wirową wprowadzono 1000 części wagowych 1,0% roztworu chitozanu w 4,0% wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym polimer charakteryzował się $M_v = 734$ kD, $Pd = 3,54$ i $DD = 73,8\%$. Przy ciągłym mieszaniu z prędkością obrotową równą 800 obr/min i włączonym układzie recyrkulacyjnym do roztworu chitozanu o $pH = 4,5$ wprowadzono 1,5 części wagowych wodnego roztworu

celulazy o nazwie *Ekonaza CE* o wyjściowej aktywności endo-1,4- β -glukanazy 2600 JCMC/cm³. Aktywność enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 2,6 J CMC/cm³. Proces kontrolowanej degradacji enzymatycznej prowadzono w temperaturze 30°C przez 30 min. Następnie do reaktora wprowadzono 4,0% wodny roztwór wodorotlenku potasu i węglanu potasu użytych w stosunku wagowym 1:1 do wytrącenia aglomeratów modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu przy odczynie pH=7,8, po czym w sposób ciągły wprowadzano z szybkością 1200 części wagowych na godzinę 1,0% wodny roztwór chitozanu w 4,0% wodnym roztworze kwasu octowego oraz 4,0% wodny roztwór wodorotlenku potasowego i węglanu sodowego, przy szybkości wprowadzania równej 869 części wagowych na godzinę, uzyskując odczyn mieszaniny reakcyjnej pH= 7,9 \pm 0,3. Równocześnie w sposób ciągły do mieszaniny reakcyjnej wprowadzano wodny roztwór celulazy wytworzonej z grzybni *Humicola insolens* o aktywności endo-1,4- β -glukanazy 0,75 J CMC/cm³. W sposób ciągły z reaktora odbierano zawiesinę modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu z taką szybkością, przy której utrzymywana była stała objętość mieszaniny reakcyjnej w reaktorze. Następnie zawiesinę odprowadzano poprzez wymiennik ciepły o temperaturze 85°C dla deaktywacji pozostałości enzymu, po czym chłodzono ją do temperatury 25°C i przekazywano do zbiornika wyrównawczego. Ze zbiornika wyrównawczego w sposób ciągły przekazywano zawiesinę modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu do urządzenia ultrafiltracyjnego wyposażonego w membranę płaską zwijaną o cut-off równym 40 kD.

Otrzymywano modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan w postaci stabilnej zawiesiny o barwie białej, charakteryzujący się zawartością polimeru równą 0,45% wagowych, M_v = 480 kD, Pd= 3,22, DD=73,8%, WRV=1350% i pH=7,25. Wydajność produktu wynosiła 28,5 części wagowych polimeru mikrokrystalicznego z 1000 części objętościowych reaktora na godzinę.

Przykład IX. Do reaktora jak z przykładzie I, wprowadzono 1500 części wagowych 1,5 % roztworu chitozanu, charakteryzującego się \bar{M}_v = 345,0, DD = 82,2% i Pd = 3,47, w 2,0 % wodnym roztworze kwasu octowego. Następnie do reaktora wprowadzono 500 części wagowych wodnego roztworu kwasu solnego o stężeniu 1,5 % wagowych i prowadzono proces kontrolowanej degradacji hydrolitycznej przy szybkości mieszania 600 obr/min w temperaturze 40 °C przez 1 godzinę. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzano w sposób ciągły z szybkością 25 cm³/min 2,5% wodny roztwór wodorotlenku sodowego, przy mieszaniu z szybkością 1500 obr/min, do wytrącenia aglomeratów mikrokrystalicznego chitozanu i uzyskania pH = 7,7. Mieszanie

kontynuowano przez 0.5 godziny z prędkością 4000 obr/min. Uzyskany produkt oczyszczano w procesie ultrafiltracji stosując membranę płaską zwijaną o cut-off równym 40 kD do uzyskania pH = 7,15 i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń.

Otrzymano 680 części wagowych modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w postaci białej żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 3,2 % wagowych polimeru, charakteryzującego się $M_v = 220$ kD, $Pd = 3,81$, $DD = 82,2$ % i $WRV = 1750$ %.

Przykład X. Do reaktora jak w przykładzie I, wprowadzono 1000 części wagowych 1,0 % roztworu chitozanu, charakteryzującego się $\bar{M}_v = 345,0$, $DD = 82,2$ % i $Pd = 3,47$, w 4,0 % wodnym roztworze kwasu octowego. Następnie prowadzono proces kontrolowanej degradacji hydrolitycznej przy szybkości mieszania 600 obr/min w temperaturze 60 °C przez 5 godzin. Do roztworu chitozanu po kontrolowanej degradacji hydrolitycznej wprowadzano w sposób ciągły z szybkością 50 cm³/min 2,5% wodny roztwór wodorotlenku sodowego przy mieszaniu z szybkością 1500 obr/min do wytrącenia aglomeratów mikrokrystalicznego chitozanu i uzyskania pH = 7,7. Mieszanie kontynuowano przez 0,5 godziny z prędkością 4000 obr/min. Uzyskany produkt oczyszczano w procesie ultrafiltracji stosując membranę płaską zwijaną o cut-off równym 40 kD do uzyskania pH = 7.15 i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń.

Otrzymano 360 części wagowych modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu w postaci białej żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 2,5 % wagowych polimeru charakteryzującego się $M_v = 250$ kD, $Pd = 3,67$, $DD = 82,2$ % i $WRV = 1450$ %.

Przykład XI. Do reaktora jak w przykładzie I, wprowadzono 1000 części wagowych 1,0 % roztworu chitozanu, charakteryzującego się $\bar{M}_v = 345,0$, $DD = 82,2$ % i $Pd = 3,47$, w 1,0 % wodnym roztworze kwasu solnego. Następnie prowadzono proces kontrolowanej degradacji hydrolitycznej przy szybkości mieszania 600 obr/min w temperaturze 50 °C przez 3 godzin. Do roztworu chitozanu po kontrolowanej degradacji hydrolitycznej wprowadzano w sposób ciągły z szybkością 50 cm³/min 2,5% wodny roztwór wodorotlenku sodowego przy mieszaniu z szybkością 1500 obr/min do wytrącenia aglomeratów mikrokrystalicznego chitozanu i uzyskania pH = 7,8. Mieszanie kontynuowano przez 0,5 godziny przy prędkości 4000 obr/min. Uzyskany produkt oczyszczano w procesie ultrafiltracji stosując membranę płaską zwijaną o cut-off równym 40 kD do uzyskania pH = 7.2 i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń.

Otrzymano 320 części wagowych modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu w postaci białej żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 2,8 % wagowych polimeru charakteryzującego się $M_v = 200$ kD, $Pd = 3,98$, $DD = 82,2$ % i $WRV = 1200$ %.

Przykład XII. Do reaktora jak w przykładzie I, wprowadzono 1000 części wagowych 1,0 % roztworu chitozanu, charakteryzującego się $\bar{M}_v = 345,0$, $DD = 82,2$ % i $Pd = 3,47$ w 2,0 % wodnym roztworze kwasu octowego. Następnie prowadzono proces kontrolowanej degradacji utleniającej w obecności 1,0% roztworu wody utlenionej, przy prędkości mieszania 600 obr/min w temperaturze 30°C przez 2 godziny. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzano w sposób ciągły z szybkością $50\text{ cm}^3/\text{min}$ 1,5% wodny roztwór wodorotlenku sodowego, podczas mieszania z szybkością 1500 obr/min, do wytrącenia aglomeratów mikrokryształicznego chitozanu i uzyskania $pH = 7,8$. Mieszanie kontynuowano przez 0,5 godziny z prędkością 3500 obr/min. Uzyskany produkt oczyszczano w procesie ultrafiltracji stosując membranę płaską zwijaną o cut-off równym 40 kD do uzyskania $pH = 7,15$ i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń.

Otrzymano 325 części wagowych modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu w postaci białej żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 2,8 % wagowych polimeru charakteryzującego się $M_v = 220$ kD, $Pd = 3,62$, $DD = 82,2$ % i $WRV = 1300$ %.

Przykład XIII. Do reaktora jak w przykładzie I, wprowadzono 1000 części wagowych 1,0 % roztworu chitozanu, charakteryzującego się $\bar{M}_v = 345,0$, $DD = 82,2$ % i $Pd = 3,47$, w 0,4 % wodnym roztworze kwasu solnego. Następnie prowadzono proces kontrolowanej degradacji w obecności 1,0% roztworu wody utlenionej przy szybkości mieszania 500 obr/min w temperaturze 20°C przez 3 godzin. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzano w sposób ciągły z szybkością $50\text{ cm}^3/\text{min}$ 0,75% wodny roztwór wodorotlenku sodowego przy mieszaniu z szybkością 1500 obr/min do wytrącenia aglomeratów mikrokryształicznego chitozanu i uzyskania $pH = 7,7$. Mieszanie kontynuowano przez 0,5 godziny z prędkością 4000 obr/min. Uzyskany produkt oczyszczano w procesie ultrafiltracji stosując membranę płaską zwijaną o cut-off równym 40 kD do uzyskania $pH = 7,22$ i całkowitego usunięcia zanieczyszczeń.

Otrzymano 220 części wagowych modyfikowanego mikrokryształicznego chitozanu w postaci białej żelopodobnej zawiesiny o stężeniu 2,5 % wagowych polimeru charakteryzującego się $M_v = 120$ kD, $Pd = 3,78$, $DD = 82,2$ % i $WRV = 1500$ %.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu poprzez wytrącanie chitozanu z jego wodnych roztworów w kwasach za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków i/lub ich soli, znamienny tym, że chitozan, którego stężenie w wodnym roztworze kwasu jest nie niższe niż 0,001% wagowego, korzystnie 0,1 - 2% wagowych, poddaje się najpierw kontrolowanej degradacji dla uzyskania założonego średniego ciężaru cząsteczkowego i stopnia polidispersji, a następnie alkalizacji, przy intensywnym mieszaniu z prędkością nie większą niż 10000 obrotów/minutę, za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków i/lub ich soli o stężeniu 0,01 - 20% wagowych do uzyskania odczynu środowiska nie niższego niż $\text{pH} = 7,0$, po czym wytrącony modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan oczyszcza się oraz ewentualnie zateża i suszy znanymi sposobami.
2. Sposób według zastrz.1, znamienny tym, że stosuje się wodne roztwory chitozanu w kwasie octowym, mlekowym, cytrynowym lub solnym, o pH nie wyższym niż 6,9.
3. Sposób według zastrz.1, znamienny tym, że w procesie alkalizacji stosuje się wodne roztwory wodorotlenku sodowego, potasowego lub amonowego i/lub ich sole, jak węglan sodowy, węglan potasowy czy węglan amonowy.
4. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że degradację chitozanu prowadzi się za pomocą enzymów, jak celulazy, chitanazy czy ksylanazy, w temperaturze nie niższej niż 20°C , korzystnie $30 - 60^{\circ}\text{C}$ w czasie od 1 minuty do 100 godzin, przy aktywności enzymów nie niższej niż 0,01 jednostek $/\text{cm}^3$, po czym pozostałe enzymy dezaktywuje się w temperaturze powyżej 70°C .
5. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że degradację chitozanu prowadzi się hydrolitycznie w temperaturze nie niższej niż 20°C , korzystnie $40 - 80^{\circ}\text{C}$, w czasie od 1 minuty do 100 godzin.

6. Sposób według zastrz. 5, znamienny tym, że degradację hydrolityczną prowadzi się w obecności mocnych kwasów, jak kwas solny czy chlorooctowy, użytych w ilości nie mniejszej niż 0,001% wagowego w stosunku do chitozanu.
7. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że degradację chitozanu prowadzi się za pomocą środków utleniających, jak nadtlenek wodoru czy nadboran sodowy, użytych w ilości nie mniejszej niż 0,001% wagowego, korzystnie 0,01 - 0,5% wagowego, w stosunku do chitozanu, w czasie nie krótszym niż 1 minuta, w temperaturze nie niższej niż 20°C, korzystnie 30 - 60°C.
8. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że prowadzi się go metodą periodyczną lub ciągłą.
9. Sposób wytwarzania modyfikowanego mikrokrystalicznego chitozanu poprzez wytrącanie chitozanu z jego wodnych roztworów w kwasach za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków lub ich soli, znamienny tym, że chitozan, którego stężenie w wodnym roztworze kwasu jest nie niższe niż 0,001% wagowego, korzystnie 0,1 - 2% wagowych, poddaje się alkalizacji, przy stosowaniu intensywnego mieszania z prędkością nie wyższą niż 10000 obrotów/minutę, za pomocą wodnych roztworów wodorotlenków i/lub ich soli o stężeniu 0,01 - 20% wagowych do uzyskania odczynu środowiska nie niższego niż $\text{pH} = 7,0$, a następnie wytrącony mikrokrystaliczny chitozan poddaje się kontrolowanej degradacji dla uzyskania założonego średniego ciężaru cząsteczkowego i stopnia polidispersji, po czym otrzymany modyfikowany mikrokrystaliczny chitozan oczyszcza się oraz ewentualnie zateża i suszy znanymi sposobami.
10. Sposób według zastrz. 9, znamienny tym, że stosuje się wodne roztwory chitozanu w kwasie octowym, mlekowym, cytrynowym lub solnym, o pH nie wyższym niż 6,9.
11. Sposób według zastrz. 9, znamienny tym, że w procesie alkalizacji stosuje się wodne roztwory wodorotlenku sodowego, potasowego lub amonowego i/lub ich sole, jak węglan sodowy, węglan potasowy czy węglan amonowy.
12. Sposób według zastrz. 9, znamienny tym, że degradację mikrokrystalicznego chitozanu prowadzi się za pomocą enzymów aktywnych w środowisku obojętnym i/lub alkalicznym, jak neutralne celulazy, w temperaturze nie niższej niż 20°C, korzystnie 30 - 60°C w czasie od 1 minuty do 100 godzin, w środowisku o pH nie niższym niż 7,0, przy aktywności enzymów nie niższej niż 0,01 jednostki CMC/cm^3 , po czym pozostałe enzymy dezaktywuje się w temperaturze powyżej 70°C.
13. Sposób według zastrz. 9, znamienny tym, że degradację mikrokrystalicznego chitozanu prowadzi się za pomocą środków utleniających, jak nadtlenek wodoru czy nadboran

sodowy, użytych w ilości nie mniejszej niż 0,001% wagowego, korzystnie 0,01 - 0,5% wagowego w stosunku do chitozanu, w czasie nie krótszym niż 1 minuta, w temperaturze nie niższej niż 20°C, korzystnie 30 - 60°C.

14. Sposób według zastrz. 9, znamieny tym, że prowadzi się go metodą periodyczną lub ciągłą.

INSTYTUT WŁÓKIEN CHEMICZNYCH
ul. M. Skłodowskiej-Curie 19/27
50-570 Łódź — tel. 37-65-10
Fax 000043133

Z-ca DYREKTORA
ds. Naukowo-Badawczych
Prof. dr hab. inż. Henryk Struszczyk

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: black dots

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.